

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key evaluation technology: Evaluation for industrialization in the field of regenerative medicine

研究開発課題名： (日本語) 再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発
(英語) Development of evaluation for industrialization in the field of regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 岩田 隆紀
所属 役職 氏名： (英語) Takanori Iwata

実施期間： 平成 28 年 5 月 24 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 同種歯根膜細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建
開発課題名： (英語) The establishment of safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet and regenerative therapy for periodontal tissue using the cell sheet.

研究開発分担者 (日本語) 安藤 智博
所属 役職 氏名： (英語) Tomohiro Ando
研究開発分担者 (日本語) 鷺尾 薫
所属 役職 氏名： (英語) Kaoru Washio

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

（和文）

・ **細胞ストック**

本研究では同種移植を目的としており、これまでの研究から若年者かつ健康なドナーより採取された細胞がより有効な再生能をもつと考えられるため、対象となるドナーを 25 歳以下の健常者と設定した。東京女子医科大学歯科口腔外科に来院した対象患者より抜去歯牙を提供してもらい、歯根面に付着している歯根膜組織を採取し、歯根膜由来間葉系幹細胞を単離した後、拡大培養により継代数 3 で凍結保存したものをマスターセルバンク(MCB)とした。尚、今年度で目標としていた 7 検体の採取、細胞ストック構築を完了している。

・ **最終製品形態**

MCB よりさらに拡大培養を行い、継代数 5 で凍結保存したものをワーキングセルバンク(WCB)として設定した。さらに WCB を融解後に拡大培養を行い、回収した細胞を温度応答性培養器材 UpCell に播種し、過密培養を行うことで歯根膜細胞シートを調製する。最終製品は歯根膜細胞シートを 3 枚重ね合わせ、輸送液を充填した一次容器に密封したものとなる。なお、最終製品を梱包する一次容器は本研究内で独自に開発したものであり、輸送容器である二次・三次容器と併せて使用することでシート構造を安定させつつ輸送することが可能となる。

・ **次世代シーケンサーを用いた核酸情報分析と有効性指標の探索**

東京女子医科大学にて採取されたヒト歯根膜由来間葉系幹細胞と、公共データベースより取得した他の間葉系幹細胞や ES 細胞等のシーケンスデータを用いて発現比較解析を実施し、間葉系幹細胞特異的に発現上昇している遺伝子群について着目し、有効性指標となり得る遺伝子を同定した。これらの有効性指標となる遺伝子をもとに、今後の治験で使用される細胞ロットの選定を実施する。

・ **一括で細胞の有効性、および安全性を評価するアルゴリズムの開発**

次世代シーケンサーを用いて微生物混入評価を実施するため、東京女子医科大学・東京大学医科学研究所所有のシーケンスデータだけでなく、公共データベースのデータも使用し、ヒトサンプルより抽出した核酸に混入している微生物由来の核酸を検知するアルゴリズムを確立した。しかし、次世代シーケンサーの作業工程内における PCR やシーケンスの際のエラーにより、異なる塩基配列のデータとして取得した際には、解析の際に微生物由来のゲノムと判定された場合でも偽陽性の可能性は皆無ではない。そこで上記の方法を検証するため、日本薬局方で定められた無菌試験陽性菌 6 種、およびマイコプラズマ陽性株 7 種をヒト歯根膜由来間葉系幹細胞にスパイク(添加)し、スパイクサンプルゲノムの検出を行い、従来の PCR 法との比較をしたところ良好な結果が得られている。今後、本試験が従来の試験の代替法となり得るかについて、さらなる検証を行っていく。

(英文)

Cell Stocks

The final goal of this project is allogeneic transplantation of periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cells (PDL-MSCs) for periodontal reconstruction. Previous studies showed MSCs isolated from young healthy donors are superior to others, therefore, the age of donors was limited less than 25 years old. Extracted teeth were collected in Tokyo Women's Medical University Hospital, and periodontal ligament tissues of each tooth was dissected, respectively. Then, MSCs were isolated, cultured, and stocked at Passage 3, as master cell banks (MCBs), respectively. In this financial year, 7 MCBs were established as planned.

Configuration of the cellular product

MCBs were thawed and cultured to construct working cell banks (WCBs) at Passage 5. WCBs were further cultured to make the final product on the temperature responsive culture dishes. Three layered MSC sheets were fabricated and packed in the original 1st package. This package is further packed in the 2nd package and the 3rd package for stable transportation.

Investigation of nucleotide sequences and efficacy evaluation

We analyzed the next-generation sequencing data of PDL-MSCs (owned by Tokyo Women's Medical University), other MSCs (in a database), and ES cells (in a database) and chose the MSC-specific marker genes and genes preferentially expressed in healthy and proliferative cell line for efficacy evaluation. These genes will be used in clinical trial for choosing PDL-MSCs that are more effective for regenerative therapy.

Development of computational pipeline of butch jobs for safety and efficacy evaluation using next-generation sequencing technology

To evaluate the microbial contamination of cell sheet products, we analyzed 242 ENCODE human RNA-seq data and evaluated pathogen identification from the RNA-seq data generated from human sample using a computational pipeline. Moreover, to confirm the accuracy of these pipeline, we analyzed DNA- or RNA-seq data generated from human samples, which were spiked either bacteria or mycoplasmas, respectively. As a result, these pipelines have shown to be able to detect the pathogen genomes from human samples using DNA-seq, which is consistent with the PCR results. Further studies are needed in order to investigate whether these new methods will be able to become an alternative method for detecting microbial contamination.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 2件）

1. Kaibuchi N, Iwata T, Yamato M, Okano T, Ando T. Multipotent mesenchymal stromal cell sheet therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a rat model. Acta Biomater. 2016, 42, 400-10.
2. Onizuka S, Iwata T, Park SJ, Nakai K, Yamato M, Okano T, Izumi Y. ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. J Cell Biochem. 2016, 117, 2423-34.
3. 岩田隆紀. 歯根膜細胞シートによる歯周組織再生. 再生医療等製品の開発と実用化展望. シーエムシー出版. 2016, 150-155.
4. 岩田隆紀. 歯周領域における再生医療. 先進医療 NAVIGATOR 本日の再生医療. 日本医学出版. 2016, 62-64.
5. 岩田隆紀. 再生医療の法令と臨床応用に向けた取り組み. じほう. 2016, 183-186.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 細胞シートを用いた歯周組織の再生, 口頭, 岩田隆紀, 第 76 回九州歯科学会総会学術大会, 2016/5/29, 国内.
2. ALP 欠損と歯科病変－歯根膜由来細胞シートによる歯周組織再生治療の展望－, 口頭, 岩田隆紀, 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016/7/21, 国内.
3. Periodontal Regeneration with Autologous Periodontal Ligament-derived Cell Sheets, 口頭, IWATA T, YAMATO M, WASHIO K, TSUMANUMA Y, YAMADA A, ONIZUKA S, IZUMI Y, ANDO T, OKANO T, ISHIKAWA I, 2016 TERMIS-AP, 2016/9/5, 国外.
4. Thermo-responsive Microfibers for Purification of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells, ポスター, NAGASE K, SAKURADA Y, IWATA T, YAMATO M, TAKEDA N, OKANO T, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo - ICBS2016, 2016/11/28, 国内.
5. 細胞シートを使った歯周組織再生－自己細胞から同種細胞へ－, 口頭, 岩田隆紀, 第 26 回インテリジェント材料・システムシンポジウム, 2017/1/11, 国内.
6. 老化で加速する歯周病の再生医療, 口頭, 岩田隆紀, 第 9 回ヘルシエイジング学会, 2017/2/25, 国内.
7. 骨組織由来間葉系細胞の多分化能は顎骨組織と腸骨組織では違うのか? ポスター, 山崎安晴, 鬼塚理, 杉本孝之, 熊澤憲一, 杉本住香, 馬場香子, 曾根由美子, 岩田隆紀, 武田啓, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.
8. 腸骨・顎骨組織由来間葉系幹細胞に対する網羅的遺伝子発現解析による検討, 口頭, 鬼塚理, 山崎安晴, 杉本孝之, 曾根由美子, 武田啓, 朴聖俊, 中井謙太, 岩田隆紀, 大和雅之, 岡野光夫, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/7, 国内.

9. 温度応答性マイクロファイバーの作製と細胞分離の検討, 口頭, 長瀬健一, 桜田耀一, 岩田隆紀, 大和雅之, 武田直也, 岡野光夫, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
10. 歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生と展望, 口頭, 岩田隆紀, 鬼塚理, 伊豆原郁月, 鷺尾薫, 妻沼有香, Sung-Joon Park, 中井謙太, 和泉雄一, 安藤智博, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
11. ミニブタを用いた様々な間葉系幹細胞シートの開発と比較, ポスター, 貝淵信之, 岩田隆紀, 鬼塚理, 矢野孝星, 鷺尾薫, 福澤智, 大和雅之, 岡野光夫, 安藤智博, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.
12. 細胞シートの長期保存方法と輸送デバイスの開発, 口頭, 伊豆原郁月, 岩田隆紀, 前田真法, 鷺尾薫, 鬼塚理, 妻沼有香, 和泉雄一, 大和雅之, 岡野光夫, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017/3/8, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 同種歯根膜細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建, 岩田隆紀, AMED 再生医療公開シンポジウム, 2017/2/2, 国内

(4) 特許出願

なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key evaluation technology: Evaluation for industrialization in the field of regenerative medicine

研究開発課題名 : (日本語) 再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発
(英語) Development of evaluation for industrialization in the field of regenerative medicine

研究開発担当者 (日本語) 岩田隆紀 東京女子医科大学先端生命医科学研究所 准教授
所属 役職 氏名 : (英語) Takanori Iwata, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Associate Professor

実施期間 : 平成 28年 5月 24日 ~ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 同種歯根膜細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建
開発課題名 : (英語) The establishment of safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet and regenerative therapy for periodontal tissue using the cell sheet.

研究開発分担者 (日本語) 和泉 雄一 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授
所属 役職 氏名 : (英語) Yuichi Izumi, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University. Professor

研究開発分担者 (日本語) 妻沼 有香 東京医科歯科大学 歯学部附属病院 医員
所属 役職 氏名 : (英語) Yuka Tsumanuma, Tokyo Medical and Dental University Dental Hospital, Clinical fellow

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合
研究開発代表者：東京女子医科大学先端生命医科学研究所・岩田隆紀
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
 1. 細胞シートの長期保存方法と輸送デバイスの開発，口頭，伊豆原るな，岩田隆紀，前田真法，鷺尾薫，鬼塚理，妻沼有香，和泉雄一，大和雅之，岡野光夫，再生医療学会，2017/03/09，国内。
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
 1. 歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生と展望，岩田隆紀，鬼塚理，伊豆原るな，鷺尾薫，妻沼有香，Park Sung-Joon，中井謙太，和泉雄一，安藤智博，再生医療学会「歯周組織・顎骨の再生治療の最先端研究と今後の課題」シンポジウム，2017/03/09，国内
- (4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 平成 28 年度「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業 (再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発)」
(英語) Project focused on developing key evaluation technology:
Evaluation for industrialization in the field of regenerative medicine
- 研究開発課題名 : (日本語) 同種歯根膜幹細胞シートの安全性・有効性評価指標の確立と歯周組織の再建
(英語) The establishment of Safety and efficacy evaluation for allogeneic periodontal ligament derived multipotent mesenchymal stromal cell sheet and regenerative therapy for periodontal tissue using the cell sheet.
- 研究開発担当者 (日本語) 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 (兼) 歯科口腔外科 准教授 岩田 隆紀
- 所属 役職 氏名 : (英語) Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Associate Professor, Takanori Iwata
- 実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 検体の塩基配列解析と安全性評価アルゴリズムの開発
開発課題名 : (英語) Development of computational methods for analyzing DNA sequences to ensure the safety of cell sheets
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医科学研究所 教授 中井謙太
所属 役職 氏名 : (英語) The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Professor, Kenta Nakai

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 岩田隆紀 総括研究報告を参照。

（和文）

・次世代シーケンサーを用いた核酸情報分析と有効性指標の探索

東京女子医科大学にて採取されたヒト歯根膜由来間葉系幹細胞と、公共データベースより取得した他の間葉系幹細胞や ES 細胞等のシーケンスデータを用いて発現比較解析を実施し、間葉系幹細胞特異的に発現上昇している遺伝子群について着目し、有効性指標となり得る遺伝子を同定した。これらの有効性指標となる遺伝子をもとに、東京女子医科大学において、今後の治験で使用する細胞ロットの選定を実施する。

・一括で細胞の有効性、および安全性を評価するアルゴリズムの開発

次世代代シーケンサーを用いて微生物混入評価を実施するため、東京女子医科大学・東京大学所有のシーケンスデータだけでなく、公共データベースのデータも使用し、ヒトサンプルより抽出した核酸に混入している微生物由来の核酸を検知するアルゴリズムを確立した。しかし、次世代シーケンサーの作業工程内における PCR やシーケンス決定の際のエラーにより、異なる塩基配列のデータとして取得した際には、解析の際に微生物由来のゲノムと判定された場合でも偽陽性の可能性は皆無ではない。そこで上記の方法を検証するため、日本薬局方で定められた無菌試験陽性菌 6 種、およびマイコプラズマ陽性株 7 種をヒト歯根膜由来間葉系幹細胞にスパイク（添加）し、スパイクサンプルゲノムの検出を行い、従来の PCR 法との比較をしたところ、比較的良好な結果が得られている。今後、本試験が従来の試験の代替法となり得るかについて、さらなる検証を行っていく。

（英文）

Investigation of nucleotide sequences and efficacy evaluation

We analyzed the next-generation sequencing data of PDL-MSCs (owned by Tokyo Women's Medical University), other MSCs (in a database), and ES cells (in a database) and chose the MSC-specific marker genes and genes preferentially expressed in healthy and proliferative cell lines for efficacy evaluation. These genes will be used in clinical trial for choosing PDL-MSCs that are more effective for regenerative therapy.

Development of a computational pipeline for evaluating the safety and efficacy of cell sheets using next-generation sequencing technology

To evaluate the microbial contamination of cell sheet products, we first analyzed 242 ENCODE human RNA-seq data and evaluated the capability of pathogen identification from the RNA-seq data of human samples. Moreover, to confirm the accuracy of our computational pipeline, we analyzed DNA-seq or RNA-seq data generated from human samples into which either bacteria or mycoplasmas were spiked. As a result, our pipelines could detect the pathogen genomes especially in the DNA-seq data, consistent with the standard PCR-based method. Further studies are needed in order to investigate whether these new methods will be able to become a practical alternative for detecting microbial contaminations.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌3件）

1. Basha Gutierrez, J., Nakai, K. A study on the application of topic models to motif finding algorithms. *BMC Bioinformatics*, 17:129-138, 2016.
2. Moon, M., Nakai, K. Stable feature selection based on the ensemble L1 -norm support vector machine for biomarker discovery. *BMC Genomics*, 17:65-74, 2016.
3. Onizuka, S., Iwata, T., Park, S. J., Nakai, K., Yamato, M., Okano, T., Izumi, Y. ZBTB16 as a Downstream Target Gene of Osterix Regulates Osteoblastogenesis of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *J Cell Biochem*, 117:2423-34, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

【口頭】

1. Myungjin Moon and Kenta Nakai, Stable feature selection based on the ensemble L1-norm support vector machine for biomarker discovery, The 15th International Conference On BioInformatics (InCoB2016), 21st Sep.2016, Biopolis , Singapore. (国外)
2. Josep Basha Gutierrez and Kenta Nakai, A Study on the application of topic models to motif finding algorithms, The 15th International Conference On BioInformatics (InCoB2016), 22nd Sep.2016, Biopolis, Singapore. (国外)
3. Sung-Joon Park, Josep Basha Gutierrez, Myungjin Moon and Kenta Nakai, Assessing the Impact of Contamination on RNA-seq Transcriptome Profiles, The 15th International Conference On BioInformatics (InCoB2016), 22nd Sep. 2016, Biopolis, Singapore. (国外)
4. 鬼塚 理, 山崎安晴, 杉本孝之, 曾根由美子, 武田 啓, 朴 聖俊, 中井謙太, 岩田隆紀, 大和雅之, 岡野光夫, 腸骨・顎骨組織由来間葉系幹細胞に対する網羅的遺伝子発現解析による検討, 第16回日本再生医療学会総会, 2017年3月7日, 仙台, 日本 (国内)
5. 岩田隆紀, 鬼塚 理, 伊豆原 るな, 鷲尾 薫, 妻沼有香, Park Sung-Joon, 中井謙太, 和泉雄一, 安藤智博, 歯根膜細胞シートを用いた歯周組織の再生と展望, 第16回日本再生医療学会総会, 2017年3月8日, 仙台, 日本 (国内)

【ポスター】

6. Sung-Joon Park, Josep Basha Gutierrez, Myungjin Moon, Kenta Nakai, Assessing the Impact of Contamination on RNA-seq Transcriptome Profiles, The 15th International Conference On BioInformatics, Sep.21-23 2016, Biopolis, Singapore (国外)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

なし